Untersuchungen zur Spreading-hemmenden Wirkung des Chloroquins

von

GEORG D. TSAKONAS

1962

Aus der Medizinischen Poliklinik der Universität München
(Direktor: Professor Dr. W. Seitz)

Untersuchungen zur Spreading-hemmenden Wirkung des Chloroquins

Inaugural-Dissertation
Zur Erlangung der Doktorwürde in der gesamten Medizin
verfaßt und einer Hohen Medizinischen Fakultät der
Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von
Georg D. Tsakonas
aus
Egira-Achaias /Griechenland
1962

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

Referent: Professor Dr. W. Seitz
Dekan: Professor Dr. W. Seitz
Tag der mündlichen Prüfung: 26.6.1962

Fotodruck: Mikrokopie G.m.b.H. München 2, Weinstr. 4

Meinen Eltern gewidmet

R. UNIV.
BIBLIOTHEEK
LEIDEN

Inhaltsverzeichnis

Problematik 5

Eigene Untersuchungen 8

Methodik 8

Versuchsreihen 10

Statistische Auswertung 16

Diskussion 27

Zusammenfassung 29

Literaturverzeichnis 30

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41546824_0088

Problematik

In früheren Untersuchungen haben M a t h i e s und Mitarbeiter [1-5] gezeigt, daß der hemmende Effekt verschiedener klinisch antirheumatisch wirkender Substanzen auf das Farbstoff-Hyaluronidase-Spreading von bestimmten Verhältnissen der Katecholamindynamik abhängig ist. Ein Absinken des Katecholaminblutspiegels scheint hierbei eine Hemmung des Spreadings zu bewirken, wobei es gleichgültig ist, ob das Absinken nach vorherigem Anstieg durch Ausschüttung aus dem Nebennierenmark oder ohne diesen unter das Normalniveau erfolgt.

Im Falle der auf ihre hemmende Wirkung auf das Spreading bisher untersuchten Substanzen (Salicylate, Phenylbutazon, Chloraethylbenzmethoxazon, im Moor wirksame Substanzen und Bienengift) findet eine Ausschüttung von Katecholaminen aus dem Nebennierenmark statt, die ihrerseits den spreadinghemmenden Effekt auslösen.

Im einzelnen haben die an männlichen Ratten durchgeführten Versuche ergeben, daß Acetylsalicylsäure, Phenylbutazon, Chloraethylbenzmethoxazon, Moorbäder und Bienengift eine Hemmung des Hyaluronidase-Spreadings auslösen, die bei adrenalektomierten Tieren ausbleibt, bei hypophysektomierten Ratten dagegen erhalten ist.

Diese Ergebnisse lassen vermuten, daß die Nebennieren für das Zustandekommen der Spreadinghemmung erforderlich sind. Zur Klärung der Frage, ob die Nebennierenrinde oder das Nebennierenmark hierbei von Bedeutung ist, wurde der Einfluß der untersuchten Substanzen auf den Ascorbinsäuregehalt der Nebennieren untersucht. Es zeigte sich in Ergänzung zu bereits von D o m e n j o z [6] durchgeführten Versuchen, daß Acetylsalicylsäure, Phenylbutazon und Moorbäder bei intakten Ratten signifikanten Ascorbinsäuredepletionseffekt aufweisen, der bei hypophysektomierten Tieren nicht vorhanden ist, obwohl die hemmende Wirkung auf das Spreading durch die Hypophysektomie nicht beeinflußt wird [7].

Es kommt also durch die geprüften spreadinghemmenden Substanzen zur Stimulierung der Nebennierenrinde, die jedoch für das Zustandekommen der Spreadinghemmung nicht verantwortlich gemacht werden kann. Dafür spricht auch die Tatsache, daß auch Prednisolon als Nebennierenrindenhormonderivat bei adrenalektomierten Tieren keine Hemmung des Hyaluronidase-Spreadings bewirkt, die bei intakten Tieren festzustellen ist [8]. Daß nach Untersuchungen von D o m e n j o z [6] z.B. Cortison keine Depletion des Ascorbinsäuregehaltes der Nebenniere hervorruft ist verständlich.

Die aus den Untersuchungen abgeleitete Vermutung, daß eine Nebennierenmarkfunktion im Wirkungsablauf spreadinghemmender Substanzen vorliegt, bedurfte einer weiteren Absicherung.

M a t h i e s und Mitarbeiter [9, 10] konnten zeigen, daß die Nebennierenmarkhormone Adrenalin und Noradrenalin bei experimenteller Zufuhr sowohl bei intakten als auch bei adrenalektomierten Tieren eine hemmende Wirkung auf das Farbstoff-Hyaluronidase-Spreading besitzen. Dieser Effekt wird durch Adrenolytika (z.B. Ergotamintartrat) aufgehoben [9]. Auch der spreadinghemmende Effekt des Natrium-Salicylates, des Phenylbutazons, des Prednisolons und der Moorbäder wird durch adrenolytisch wirkende Substanzen blockiert [9].

Ganglienblocker (Pendiomid, Penthonium, Camphidonium und Ecolid), die das Nebennierenmark als differenziertes Ganglion blockieren, heben die spreadinghemmende Wirkung des Natrium-Salicylates, des Phenylbutazons, des Prednisolons, der Moorsubstanzen und des Bienengiftes nicht dagegen die des Adrenalins und Noradrenalins auf [5,11].

Die Tatsache, daß die Spreadinghemmende Wirkung des Adrenalins und Noradrenalins bei experimenteller Zufuhr früher eintritt als die der Salicylate, Pyrazolone und Nebennierenrindensteroide ist durch die Annahme erklärlich, daß diese Stoffe erst über eine Katecholaminausschüttung aus dem Nebennierenmark wirken [10].

Weiter ergaben die Untersuchungen, daß der Hyaluronidase-Spreading-hemmende Effekt des Adrenalins und Noradrenalins in seinem Maximum erst zu einem Zeitpunkt sichtbar wird, wenn der primäre, an der

Pupillenweite meßbare Katecholamineffekt bereits abgeklungen ist [10]. Hieraus wurde die Vermutung abgeleitet, daß keine direkte Katecholaminwirkung hinsichtlich der Hemmung des Hyaluronidase-Spreadings vorliegen kann.

Nachdem durch weitere Untersuchungen von S c h l i e r f [12] ausgeschlossen werden konnte, daß ein gegenregulatorischer vagaler Effekt oder die Notwendigkeit der Anwesenheit einer genügenden Menge von Katecholamin-Metaboliten vorliegt, wurde vermutet, daß das Absinken des durch die Ausschüttung erhöhten Katecholaminblutspiegels den Hyaluronidase-Spreading-hemmenden Effekt auslöst. Durch Adrenalin-Dauerinfusionen an adrenalektomierten Tieren wurde gezeigt, daß während der Infusionen keine Hyaluronidasehemmung auftritt [4]. Diese ist erst in entsprechendem Zeitabstand nach Absetzen der Infusion festzustellen. Wenn, während der Infusionen, die den Katecholaminblutspiegel auf ein höheres Niveau einstellen, akut zusätzliche Adrenalindosen injiziert werden, tritt die Spreadinghemmung bereits während der Infusionen im entsprechenden zeitlichen Abstand nach zusätzlichen Injektionen auf [4]. Dieses Versuchsergebnis spricht dafür, daß nicht das Absinken auf das normale Niveau, sondern bereits eine relative Niveaudifferenz Hyaluronidase-Spreading-hemmend wirksam wird.

Differenzierte Versuchsanordnungen mit Gaben von Reserpin [13] und Iproniacid [14] ließen vermuten, daß auch das Absinken des normalen Katecholaminblutspiegels auf niedrigere Werte bzw. die "chemische Sympathicusblockade" des Reserpins die Hyaluronidase-Spreadinghemmung auslöst. Die notwendige Niveaudifferenz des Katecholaminblutspiegels, die eine Hyaluronidase-Spreadinghemmung deutlich macht, liegt nach M a t h i e s [4] vermutlich unter 1γ Adrenalin oder Noradrenalin pro 100 g Tiergewicht, da die experimentell i.v. zugeführte Mindestmenge, die noch eine Hemmung des Hyaluronidase-Spreadings auslöst, zwischen 0,5γ und 1γ pro 100 g beträgt. Hierbei weisen Adrenalin und Noradrenalin in gleicher Dosierung eine quantitativ annähernd gleiche Wirkung auf.[4]

In Ergänzung zu den genannten Untersuchungen über die Beeinflussung der Katecholamindynamik durch Hyaluronidase-Spreading-hemmen-

de Substanzen sollten in der vorgelegten Arbeit die bei Anwendung des Chloroquins vorliegenden Verhältnisse untersucht werden.

Eigene Untersuchungen

Methodik

Vor und zu verschiedenen Zeiten nach subcutaner Applikation von 10 mg Chloroquindiphosphat (Resochin), entsprechend 6 mg Base pro 100 g Tiergewicht, wurden je eine Farbstoffquaddel (F) mit 0,1 ccm einer 0,06%igen Evansblau-Lösung und eine Farbstoff+Hyaluronidase-Quaddel (FH) mit ebenfalls 0,1 ccm der gleichen Farbstofflösung, in der 75 IE einer hochgereinigten Testes-Hyaluronidase pro ccm gelöst waren, streng intracutan in die mit Pilca enthaarte Bauchhaut männlicher weißer Ratten im Gewicht von 150 bis 200 g gesetzt. Die nach jeweils 10 Minuten erreichte Ausbreitung der Farbstoff-Flecken wurde durch Übertragung der Konturen auf einen Filmstreifen und anschließende planimetrische Ausmessung bestimmt.

Am gleichen Tier lassen sich je 3 Quaddelpaare setzen, so daß außer dem Kontrollwert je 2 Bestimmungen nach Chloroquin-Applikation durchgeführt werden können. Die Bauchhaut stellt damit ein Versuchsfeld mit 6 verschiedenen Lokalisationsmöglichkeiten dar. Um etwaige Einflüsse der jeweiligen Lokalisation auf die Versuchsergebnisse zu überprüfen, wurden die Versuche jeder Versuchsreihe als sogenannte "Lateinische Quadrate" angelegt. Für jede Versuchsreihe wurden entsprechend der 6 möglichen Lokalisationen 6 Versuchstiere herangezogen. Jedes der 6 Verfahren wurde dabei an jeder der 6 Lokalisationen in zufälliger Anordnung einmal appliziert. Die Versuche wurden in Evipan-Narkose mit 30 mg Evipan-Natrium pro 100 g Tiergewicht durchgeführt.

Ergotamintartrat wurde als Gynergen in Versuchsreihe 4 und 5 mit 0,8 mg pro 100 g Tiergewicht pro Injektion subcutan verabreicht. Als Ganglienblocker wurde in Versuchsreihe 3 Pentamethoniumdibromid (Pendiomid) mit 5 mg pro Tier i.v. appliziert.

Die angegebenen Ergotamin- und Pendiomid-Dosen sowie die Applikationszeiten vor bzw. nach Gabe des Chloroquins erwiesen sich von früheren Untersuchungen von M a t h i e s und Mitarbeitern als blockierend wirksam hinsichtlich des Hyaluronidase-Spreading-hemmenden Effektes des Natrium-Salicylates, des Phenylbutazons, des Prednisolons und der im Moor wirksamen Substanzen [9,11].

Die Adrenalektomien in Versuchsreihe 6 wurden 48 Stunden vor dem Versuch durchgeführt.

Versuchsreihen

Versuchsreihe 1

Nach Ablesen der Kontrollquaddeln bei intakten Ratten wurde 10 mg Resochin pro 100 g Tiergewicht s.c. injiziert. Das Setzen der weiteren Quaddelpaare erfolgte 20 Minuten und 50 Minuten nach Resochinapplikation.

Tier	Fv	F20'	F50'	FHv	FH20'	FH50'
1	130	159	137	248	230	199
2	135	150	170	219	190	200
3	166	153	141	230	224	220
4	163	133	129	230	215	195
5	170	165	142	230	217	200
6	137	110	110	220	199	174

Lokalisation

Tier	4	3	1	6	2	5
1	Fv	F50'	FH20'	FH50'	F20'	FHv
2	FHv	Fv	F50'	FH20'	FH50'	F20'
3	F20'	FHv	Fv	FH50'	FH20'	F50'
4	FH50'	F20'	FHv	Fv	F50'	FH20'
5	FH20'	FH50'	F20'	FHv	Fv	F50'
6	F50'	FH20'	FH50'	F20'	FHv	Fv

T a b e l l e 1

Versuchsreihe 2

Nach Ablesen der Kontrollquaddeln bei intakten Ratten wurde 10 mg Resochin pro 100 g Tiergewicht s.c. injiziert. Das Setzen der weiteren Quaddelpaare erfolgte 30 Minuten und 70 Minuten nach Resochin-Applikation.

Tier	Fv	F30'	F70'	FHv	FH30'	FH70'
1	155	148	120	200	184	163
2	125	115	130	200	189	172
3	130	120	115	195	180	175
4	150	130	138	217	195	185
5	155	140	115	220	198	179
6	155	150	127	220	210	199

Lokalisation

Tier	4	3	1	6	2	5
1	Fv	F70'	FH30'	FH70'	F30'	FHv
2	FHv	Fv	F70'	FH30'	FH70'	F30'
3	F30'	FHv	Fv	F70'	FH30'	FH70'
4	FH70'	F30'	FHv	Fv	F70'	FH30'
5	FH30'	FH70'	F30'	FHv	Fv	F70'
6	F70'	FH30'	FH70'	F30'	FHv	Fv

T a b e l l e 2

Versuchsreihe 3

Unmittelbar nach Ablesen der Kontrollquaddeln bei intakten Ratten wurde 5 mg Pendiomid pro Tier i.v. appliziert, nach 30 Minuten erfolgte die subcutane Injektion von 10 mg Resochin pro 100 g Tiergewicht und unmittelbar danach von nochmal der gleichen Pendiomid-Dosis (5 mg pro Tier). Die weiteren Quaddelpaare wurden 20 Minuten und 50 Minuten nach Resochin-Applikation gesetzt.

Tier	Fv	F20'	F50'	FHv	FH20'	FH50'
1	130	125	120	215	197	187
2	123	110	98	210	203	185
3	130	115	100	200	183	162
4	140	132	120	190	185	180
5	143	130	98	210	205	197
6	118	110	95	180	160	145

Lokalisation

Tier	2	4	5	1	3	6
1	FH50'	F20'	FHv	Fv	F50'	FH20'
2	FH20'	FH50'	F20'	FHv	Fv	F50'
3	F50'	FH20'	FH50'	F20'	FHv	Fv
4	Fv	F50'	FH20'	FH50'	F20'	FHv
5	FHv	Fv	F50'	FH20'	FH50'	F20'
6	F20'	FHv	Fv	F50'	FH20'	FH50'

T a b e l l e 3

Versuchsreihe 4

Unmittelbar nach Ablesen der Kontrollquaddeln bei intakten Ratten wurde 0,8 mg Ergotamin pro 100 g Tiergewicht s.c. appliziert, nach 30 Minuten erfolgte die subcutane Injektion von 10 mg Resochin pro 100 g Tiergewicht und unmittelbar danach von nochmal der gleichen Ergotamin-Dosis (0,8 mg pro 100 g Tiergewicht). Die weiteren Quaddelpaare wurden 20 Minuten und 50 Minuten nach Resochin-Applikation gesetzt.

Tier	Fv	F20'	F50'	FHv	FH20'	FH50'
1	125	123	105	158	150	147
2	125	128	105	180	135	120
3	170	137	118	185	170	162
4	137	125	117	205	188	180
5	140	135	132	165	152	137
6	135	129	128	230	210	190

Lokalisation

Tier	5	3	6	1	2	4
1	FHv	Fv	F20'	F50'	FH50'	FH20'
2	FH20'	FHv	Fv	F20'	F50'	FH50'
3	FH50'	FH20'	FHv	Fv	F20'	F20'
4	F50'	FH50'	FH20'	FHv	Fv	F20'
5	F20'	F50'	FH50'	FH20'	FHv	Fv
6	Fv	F20'	F50'	FH50'	FH20'	FHv

Tabelle 4

Versuchsreihe 5

Unmittelbar nach Setzen der Kontrollquaddeln bei intakten Ratten wurden 0,8 mg Ergotamin pro 100 g Tiergewicht s.c. appliziert, nach 30 Minuten erfolgte die Applikation von 10 mg Resochin pro 100 g Tiergewicht und nach weiteren 10 Minuten eine nochmalige Injektion von 10 mg Ergotamin pro 100 g Tiergewicht. Die weiteren Quaddelpaare wurden nach 30 Minuten und 50 Minuten gesetzt.

Tier	Fv	F20'	F50'	FHv	FH20'	FH50'
1	150	140	120	213	175	165
2	140	130	123	230	200	197
3	140	130	137	215	180	183
4	153	143	127	223	218	178
5	145	132	115	222	190	180
6	152	147	132	240	228	197

Lokalisation

Tier	4	1	3	5	6	2
1	FH50'	F20'	Fv	FHv	FH20'	F50'
2	F50'	FH50'	F20'	Fv	FHv	FH20'
3	FH20'	F50'	FH50'	F20'	Fv	FHv
4	FHv	FH20'	F50'	FH50'	F20'	Fv
5	Fv	FHv	FH20'	F50'	FH50'	F20'
6	F20'	Fv	FHv	FH20'	F50'	FH50'

Tabelle 5

Versuchsreihe 6

Die Versuche dieser Versuchsreihe wurden an adrenalektomierten Ratten durchgeführt. Es wurden 10 mg Resochin pro 100 g Tiergewicht nach Ablesen der Kontrollquaddeln s.c. appliziert, und die weiteren Quaddelpaare nach 20 Minuten und 50 Minuten nach Resochin-Applikation gesetzt.

Tier	Fv	F20'	F50'	FHv	FH20'	FH50'
1	150	123	127	210	177	153
2	143	132	120	197	173	172
3	160	145	140	230	205	185
4	160	140	130	220	195	165
5	167	150	140	220	210	180
6	130	110	105	210	190	175

Lokalisation

Tier	3	4	1	5	6	2
1	FH20'	FH50'	F20'	Fv	FHv	F50'
2	F50'	FH20'	FH50'	F20'	Fv	FHv
3	FHv	F20'	FH20'	FH50'	F50'	Fv
4	Fv	FHv	F50'	FH20'	FH50'	F20'
5	F20'	Fv	FHv	F50'	FH20'	FH50'
6	FH50'	F20'	Fv	FHv	F50'	FH20'

Tabelle 6

Statistische Auswertung der Versuchsergebnisse

1. Statistisches Modell und Methodik

Die statistische Auswertung der Versuchsergebnisse hat als primäre Aufgabe die Bestimmung der experimentellen Variabilität. Die Gesamt-Variabilität der Versuchsergebnisse wird hierbei in Komponenten zerlegt, die den einzelnen systematischen Faktoren entsprechen, welche das Versuchsergebnis beeinflussen. Derjenige Anteil der Gesamt-Variabilität, der sich dabei nicht als Folge solcher systematischer Faktoren erklären läßt, wird dann als Schätzung der experimentellen Variabilität aufgefaßt. Es können hierbei jedoch nur solche systematischen Faktoren erfaßt werden, die bereits bei der Planung der Versuche entsprechend berücksichtigt wurden.

Bei der Planung der hier vorliegenden Versuche wurden folgende systematischen Faktoren berücksichtigt:

Individuelles Reaktionsniveau der Versuchstiere;
Wirkung der 6 Verfahren;
systematischer Einfluß der Lokalisation.

Zur Bestimmung der Variabilitäten, die zu diesen systematischen Faktoren gehören, bedienten wir uns einer mehrfachen Varianz-Analyse. Diesen Varianz-Analysen liegt ein lineares statistisches Modell zugrunde, bei dem angenommen wird, daß sich die Wirkung der einzelnen Faktoren in additiver Form unabhängig überlagert. Der Einfluß, den die einzelnen systematischen Faktoren auf die Gesamt-Variabilität haben, ergibt sich in den Varianz-Analysen in Form von "Varianz-Komponenten", die den einzelnen systematischen Faktoren entsprechen. Die Schätzungen der experimentellen Variabilitäten liefern die Varianz-Analysen in Form der "Rest-Varianz".

Primär ist zu untersuchen, ob ein systematischer Faktor einen statistisch gesicherten Einfluß auf die Versuchsergebnisse besitzt. Dies ist nur dann der Fall, wenn die zugehörige Varianz-Komponente statistisch gesichert größer ist als die experimentelle Variabilität (Rest-Varianz). Ob dies der Fall ist, wird in den Varianz-Analysen durch einen Vergleich dieser Varianz-Komponenten mit Hilfe des F-Tests geprüft.

Entsprechend der Fragestellung, die den Versuchen zugrunde lag, interessierte hier primär nur der Einfluß, den die 6 Verfahren auf die Diffusionsgeschwindigkeit der Quaddeln ausüben. Hierbei war zunächst zwischen den beiden Quaddel-Typen zu unterscheiden; außerdem war für jeden Quaddel-Typus einzeln zu prüfen, ob statistisch gesicherte Unterschiede zwischen den Kontrollen und den Versuchszeiten einerseits und zwischen den Versuchszeiten selbst andererseits bestehen. Diesen Fragestellungen entspricht in den Varianz-Analysen je eine "orthogonale Komponente", der Varianz-Komponenten, die zu dem systematischen Faktor "Verfahren" gehört. Ein statistisch gesicherter Einfluß der Prüfsubstanz auf die Diffusionsgeschwindigkeit eines Quaddel-Typus liegt nur dann vor, wenn mindestens eine der beiden orthogonalen Komponenten, die zu diesem Quaddel-Typus gehören, statistisch gesichert größer ist als die Rest-Varianz. Die Prüfung dieser Frage wurde ebenfalls mit Hilfe des F-Tests durchgeführt.

Das lineare statistische Modell und somit die Varianz-Analyse läßt keinen Schluß auf die absolute Wirksamkeit eines "Verfahrens" zu; es ist vielmehr nur möglich, den Unterschied in der Wirksamkeit je zweier "Verfahren" statistisch zu prüfen. Die Größe dieses Unterschiedes wird hierbei auf folgende Weise geschätzt: Es sei hierzu $\bar{x}V$ das arithmetische Mittel aller Meßwerte, die für das Verfahren V beobachtet wurden. Die Differenz zwischen den Mittelwerten, die zu 2 verschiedenen Verfahren gehören, ist dann eine optimale Schätzung für den Unterschied in der "Wirkung der Verfahren"; gemessen wird hierbei die Differenz zwischen den Diffusionsgeschwindigkeiten, die zu diesen beiden Verfahren gehören. Bei der Fragestellung, die den Versuchen zugrunde lag, interessierte hier primär der Unterschied

$$\sigma\bar{x}(t) = \bar{x}(t) - \bar{x}(K)$$

zwischen den Versuchszeiten t und der Kontrolle K. Im Prinzip wird in den Varianz-Analysen nichts anderes geprüft als die Frage, ob diese Mittelwertsdifferenzen $\sigma\bar{x}(t)$ statistisch gesichert von 0 verschieden sind.

2. Darstellung der Ergebnisse der statistischen Auswertung

Die Ergebnisse der statistischen Auswertung sind in den Tabellen 7-12 wiedergegeben. Im oberen Teil dieser Tabellen ist für jede Versuchsreihe das Ergebnis der zugehörigen Varianz-Analyse angegeben; im unteren Teil finden sich für jedes Verfahren die Mittelwerte $\bar{x}(V)$ und außerdem die Mittelwertsdifferenzen $\sigma\bar{x}(t) = \bar{x}(t) - \bar{x}(K)$. Soweit sich aus den Varianz-Analysen ergab, daß eine Mittelwertsdifferenz $\sigma\bar{x}(t)$ statistisch gesichert von 0 verschieden ist, wurde in der Spalte "Sicherung" angegeben, mit welcher Irrtumswahrscheinlichkeit diese Aussage maximal belastet ist. In der mit "Hemmung" überschriebenen Spalte ist schließlich die in üblicher Weise errechnete prozentuale Hyaluronidasehemmung angegeben.

In den Schemata der Varianz-Analysen bedeutet:

- n: die Zahl der Freiheitsgrade der Varianz-Komponente;
- SAQ: das Summen-Abstands-Quadrat der Varianz-Komponente;
- MAQ: das Mittlere Abstands-Quadrat der Varianz-Komponente;
- $F_{emp.}$: den Varianz-Quotienten zwischen der jeweiligen Varianz-Komponente und der experimentellen Variabilität (Rest-Varianz);
- p: die Überschreitungswahrscheinlichkeit des Varianz-Quotienten $F_{emp.}$ in der zugehörigen F-Prüfverteilung.

Ein statistisch gesicherter Einfluß eines systematischen Faktors bzw. ein statistisch gesicherter Unterschied zwischen den verschiedenen Verfahren liegt nur dann vor, wenn der zugehörige Varianz-Quotient $F_{emp.}$ eine Überschreitungswahrscheinlichkeit besitzt, die nicht größer ist als 5%. Von einer ausreichenden statistischen Sicherung kann allerdings erst dann gesprochen werden, wenn die Überschreitungswahrscheinlichkeit des Varianz-Quotienten sogar kleiner als 1% ist. Eine Irrtumswahrscheinlichkeit für die Aussage, eine Mittelwertsdifferenz $\sigma\bar{x}(t)$ sei statistisch gesichert von 0 verschieden, wurde daher nur angegeben, wenn diese nicht größer ist als 5%.

Entsprechend der Definition der Mittelwertsdifferenz $\sigma\bar{x}(t)$ bedeutet

ein negatives Vorzeichen dieser Differenz, daß die Quaddel zum Zeitpunkt t kleiner sind als die Kontroll-Quaddeln. Es liegt also in diesem Falle eine Hemmung der Ausbreitungsgeschwindigkeit des jeweiligen Quaddel-Typus vor.

3. Diskussion der Ergebnisse der statistischen Auswertung

Versuchsreihe 1 und 2:

Zu den Zeitpunkten 30' und 70' nach Applikation von Resochin ergibt sich ein statistisch hoch gesicherter Einfluß des Resochins auf die Ausbreitungsgeschwindigkeit der reinen Farbstoff-Quaddel. Es handelt sich hierbei, wie aus dem Vorzeichen der Mittelwertsdifferenz $\sigma\,\bar{x}(t)$ hervorgeht, um eine Verminderung der Diffusionsgeschwindigkeit dieses Quaddel-Typus.

Bei der Farbstoff+Hyaluronidase-Quaddel ergibt sich zu sämtlichen Versuchszeiten ein statistisch gesicherter Einfluß der Applikation von Resochin auf deren Ausbreitungsgeschwindigkeit; auch hier zeigt das Vorzeichen der Mittelwertsdifferenz $\sigma\,\bar{x}(t)$, daß es sich hierbei um eine Hemmung in der Ausbreitungsgeschwindigkeit handelt. Ihren maximalen Wert erreicht diese Hemmung zu den Zeitpunkten 50' und 70' nach Applikation von Resochin; sie ist zu diesen beiden Zeitpunkten praktisch gleich.

Ein Einfluß der Lokalisation bei diesen Versuchsreihen ließ sich nur bei der Teil-Versuchsreihe a (Versuchszeiten 20' und 50') feststellen; es hat hier den Anschein, als sei in den Lokalisationen 3 und 6 die Ausbreitungsgeschwindigkeit der einzelnen Quaddeln systematisch größer. Bei der Teilversuchsreihe b konnte ein entsprechender Effekt nicht festgestellt werden; selbst die oben angedeutete Tendenz zur Vergrößerung der Quaddeln in den Lokalisationen 3 und 6 läßt sich hier nicht feststellen.

Versuchsreihe 3:

Gegenüber den Versuchsreihen 1 und 2 weist diese Versuchsreihe eine wesentlich höhere experimentelle Variabilität auf; daher sind, bei praktisch gleichen Effekten wie in den Versuchsreihen 1 und 2, die Veränderungen in der reinen Farbstoff-Quaddel bei dieser Versuchsreihe statistisch nicht zu sichern. Sowohl die reine Farbstoff-Quaddel als auch die Farbstoff+Hyaluronidase-Quaddel weist eine

Hemmung ihrer Ausbreitungsgeschwindigkeit auf; diese ist für die Farbstoff+Hyaluronidase-Quaddel statistisch hoch gesichert. Die Größe der Mittelwertsdifferenzen zeigt, daß sich die Veränderungen der beiden Quaddel-Typen in dieser Versuchsreihe praktisch nicht gegenüber denjenigen zu den gleichen Versuchszeiten der Versuchsreihe 1 unterscheiden.

Versuchsreihe 4:

Auch bei der Versuchsanordnung, wie sie in dieser Versuchsreihe getroffen wurde, tritt eine Hemmung in der Ausbreitungsgeschwindigkeit der beiden Quaddel-Typen auf; sie ist in jedem Falle statistisch gesichert. Die Größe dieser Hemmungen, gemessen an den Mittelwertsdifferenzen, entspricht praktisch denjenigen der Versuchsreihen 1 und 2 zu den entsprechenden Versuchszeiten.

Versuchsreihe 5:

Auch bei dieser Versuchsreihe liegen für sämtliche Versuchszeiten statistisch gesicherte Hemmungen in den Ausbreitungsgeschwindigkeiten der beiden Quaddel-Typen vor. Die Größe dieser Hemmungen, gemessen an den Mittelwertsdifferenzen ist praktisch die gleiche wie in den Versuchsreihen 1 und 2.

Versuchsreihe 6:

Auch bei den adrenalektomierten Tieren lassen sich zu sämtlichen Versuchszeiten statistisch gesicherte Hemmungen in den Ausbreitungsgeschwindigkeiten der beiden Quaddel-Typen nachweisen. Die Größe dieser Hemmungen, gemessen an den Mittelwertsdifferenzen $\sigma_{\bar{x}}(t)$, entspricht annähernd der Größe der Hemmungen zu den entsprechenden Zeitpunkten der Versuchsreihen 1 und 2, eher sind sie in der vorliegenden Versuchsreihe etwas größer.

Zusammenfassung der Ergebnisse:

Zusammenfassend ergibt sich, daß bei sämtlichen Versuchsanordnungen statistisch gesicherte Hemmungen beider Quaddel-Typen zu sämtlichen Versuchszeiten vorliegen; die Größe dieser Hemmung zu entsprechenden Versuchszeiten ist praktisch bei allen Versuchsanordnungen gleich. Es hat lediglich den Anschein, als wäre diese Hemmung bei den adrenalektomierten Tieren etwas größer; es kann sich jedoch hierbei um einen rein zufälligen Effekt handeln.

Varianz-Komponente	n	SAQ	MAQ	$F_{emp.}$	p
Zwischen Tieren	5	3.749	750	5,64	1%
Zwischen Verfahren	5	46.129	9.226	69,37	0,1%
Zwischen Lokalisationen	5	1.955	391	2,94	5%
Zw. Quaddel-Typen	1	42.711	42.711	100,00	0,1%
Zw.Kontr.u.V-Zeiten(Farbst)	1	295	295	2,22	-
Zw. Versuchs-Zeiten(Farbst)	1	140	140	1,05	-
Zw.Kontr.u.V-Zeiten(Hyase)	1	2.352	2.352	17,68	0,1%
Zw. Versuchs-Zeiten(Hyase)	1	631	631	4,74	5%
Rest-Varianz	20	2.659	133		
Gesamt-Varianz	35	54.492	1.557		

	$\bar{x}(V)$	$s^2(V)$	$\bar{x}(t) - \bar{x}(K)$	Hemmung	Sicherung
F_V	150	324			
FH_V	229	109			
$F_{20'}$	145	411	- 5		-
$FH_{20'}$	212	231	- 17	20,0%	1%
$F_{50'}$	138	383	- 12		-
$FH_{50'}$	198	216	- 31	37,0%	0,1%

Tabelle 7
(Versuchsreihe 1)

Varianz-Komponente	n	SAQ	MAQ	$F_{emp.}$	p
Zwischen Tieren	5	2.530	506	6,84	0,1%
Zwischen Verfahren	5	35.367	7.073	95,58	0,1%
Zwischen Lokalisationen	5	428	86	1,16	-
Zw. Quaddel-Typen	1	31.388	31.388	100,00	0,1%
Zw.Kontr.u.V-Zeiten(Farbst)	1	1.024	1.024	13,84	1%
Zw. Versuchs-Zeiten(Farbst)	1	280	280	3,78	-
Zw.Kontr.u.V-Zeiten(Hyase)	1	2.101	2.101	28,39	0,1%
Zw. Versuchs-Zeiten(Hyase)	1	574	574	7,76	5%
Rest-Varianz	20	1.475	74		
Gesamt-Varianz	35	39.800	1.137		

	$\bar{x}(V)$	$s^2(V)$	$\bar{x}(t) - \bar{x}(K)$	Hemmung	Sicherung
F_V	145	190			
FH_V	209	133			
$F_{30'}$	134	212	- 11		1%
$FH_{30'}$	193	117	- 16	21,5%	1%
$F_{70'}$	124	84	- 21		1%
$FH_{70'}$	179	151	- 30	40,1%	0,1%

Tabelle 8
(Versuchsreihe 2)

Varianz-Komponente	n	SAQ	MAQ	$F_{emp.}$	p
Zwischen Tieren	5	3.520	704	8,38	0,1%
Zwischen Verfahren	5	47.715	9.543	100,00	0,1%
Zwischen Lokalisationen	5	571	114	1,36	-
Zw. Quaddel-Typen	1	43.890	43.890	100,00	0,1%
Zw.Kontr.u.V-Zeiten(Farbst)	1	1.284	1.284	15,29	0,1%
Zw. Versuchs-Zeiten(Farbst)	1	690	690	8,21	1%
Zw.Kontr.u.V-Zeiten(Hyase)	1	1.357	1.357	16,16	0,1%
Zw. Versuchs-Zeiten(Hyase)	1	494	494	5,88	5%
Rest-Varianz	20	1.680	84		
Gesamt-Varianz	35	53.486	1.528		

	$\bar{x}(V)$	$s^2(V)$	$\bar{x}(t) - \bar{x}(K)$	Hemmung	Sicherung
F_V	131	92			
FH_V	201	184			
$F_{20'}$	120	99	- 11		1%
$FH_{20'}$	189	282	- 12	14,6%	1%
$F_{50'}$	105	135	- 26		0,1%
$FH_{50'}$	176	363	- 25	30,2%	0,1%

Tabelle 9
(Versuchsreihe 3)

Varianz-Komponente	n	SAQ	MAQ	$F_{emp.}$	p
Zwischen Tieren	5	6.784	1.357	5,24	1%
Zwischen Verfahren	5	19.958	3.992	15,41	0,1%
Zwischen Lokalisationen	5	1.088	218	-	
Zw. Quaddel-Typen	1	15.625	15.625	60,33	0,1%
Zw.Kontr.u.V-Zeiten(Farbst)	1	920	920	3,55	-
Zw. Versuchs-Zeiten(Farbst)	1	432	432	1,67	-
Zw.Kontr.u.V-Zeiten(Hyase)	1	2.584	2.584	9,98	1%
Zw. Versuchs-Zeiten(Hyase)	1	397	397	1,53	-
Rest-Varianz	20	5.179	259		
Gesamt-Varianz	35	33.009	943		

	$\bar{x}(V)$	$s^2(V)$	$\bar{x}(t) - \bar{x}(K)$	Hemmung	Sicherung
F_v	139	275			
FH_v	187	710			
$F_{20'}$	129	30	- 10		-
$FH_{20'}$	167	767	- 20	33,5%	1%
$F_{50'}$	117	127	- 22		-
$FH_{50'}$	156	701	- 31	53,1%	1%

T a b e l l e 10
(Versuchsreihe 4)

Varianz-Komponente	n	SAQ	MAQ	$F_{emp.}$	p
Zwischen Tieren	5	1.980	396	5,01	1%
Zwischen Verfahren	5	44.897	8.979	100,00	0,1%
Zwischen Lokalisationen	5	667	133	1,68	-
Zw. Quaddel-Typen	1	38.547	38.547	100,00	0,1%
Zw.Kontr.u.V-Zeiten(Farbst)	1	940	940	11,90	1%
Zw. Versuchs-Zeiten(Farbst)	1	385	385	4,87	5%
Zw.Kontr.u.V-Zeiten(Hyase)	1	4.334	4.334	54,86	0,1%
Zw. Versuchs-Zeiten(Hyase)	1	690	690	8,73	1%
Rest-Varianz	20	1.583	79		
Gesamt-Varianz	35	49.127	1.404		

	$\bar{x}(V)$	$s^2(V)$	$\bar{x}(t) - \bar{x}(K)$	Hemmung	Sicherung
F_V	147	34			
FH_V	224	100			
$F_{20'}$	137	54	- 10		5%
$FH_{20'}$	198	444	- 26	29,0%	1%
$F_{50'}$	126	65	- 21		1%
$FH_{50'}$	183	150	- 41	46,4%	0,1%

T a b e l l e 11
(Versuchsreihe 5)

Varianz-Komponente	n	SAQ	MAQ	$F_{emp.}$	p
Zwischen Tieren	5	3.694	739	11,37	0,1%
Zwischen Verfahren	5	34.982	6.996	100,00	0,1%
Zwischen Lokalisationen	5	310	62	-	
Zw. Quaddel-Typen	1	27.501	27.501	100,00	0,1%
Zw.Kontr.u.V-Zeiten(Farbst)	1	1.849	1.849	28,45	0,1%
Zw. Versuchs-Zeiten(Farbst)	1	120	120	1,85	-
Zw.Kontr.u.V-Zeiten(Hyase)	1	4.312	4.312	66,34	0,1%
Zw. Versuchs-Zeiten(Hyase)	1	1.200	1.200	18,46	0,1%
Rest-Varianz	20	1.299	65		
Gesamt-Varianz	35	40.285	1.151		

	$\bar{x}(V)$	$s^2(V)$	$\bar{x}(t) - \bar{x}(K)$	Hemmung	Sicherung
F_V	151	184			
FH_V	214	129			
$F_{20'}$	133	222	- 18		0,1%
$FH_{20'}$	192	218	- 22	29,6%	0,1%
$F_{50'}$	127	176	- 24		0,1%
$FH_{50'}$	172	130	- 42	55,5%	0,1%

T a b e l l e 12
(Versuchsreihe 6)

Diskussion

Die Versuchsergebnisse zeigen, daß Chloroquin eine statistisch signifikante hemmende Wirkung auf das Hyaluronidase-Spreading besitzt, die nicht durch das Adrenolytikum Ergotamintartrat und den Ganglienblocker Pendiomid aufgehoben wird. Auch das Farbstoff-Spreading ohne Hyaluronidasebeigabe weist eine deutliche Hemmung auf, die teilweise statistisch gesichert werden konnte. Bei der bisherigen unvollständigen Kenntnis der Abhängigkeit der Permeabilität der Grundsubstanz von Hyaluronsäuren-Hyaluronidase-System muß offen bleiben, ob hier ein hyaluronidase-unabhängiger permeabilitätshemmender Effekt oder eine Beeinflussung der gewebseigenen Hyaluronidase in der Rattenbauchhaut vorliegt. Damit sind im Falle des Chloroquins anders gelagerte Verhältnisse gegenüber den übrigen geprüften spreadinghemmenden Substanzen, die ihre Wirkung über eine Katecholaminfreisetzung aus dem Nebennierenmark entfalten. Ähnliche Verhältnisse fanden M a t h i e s und R e i n d l [14] auch bei der Monoaminoxydase-hemmenden Substanz Iproniacid, die ebenfalls das Hyaluronidase-Spreading hemmt, wobei diese Wirkung nicht durch Ganglienblocker und Adrenolytica blockierend beeinflußt wird. Es fand sich lediglich eine geringere Hemmung unter dem Einfluß von Ergotamin und Pendiomid, wie wir es angedeutet auch im Falle des Chloroquins und Pendiomids sahen. Nach diesen Versuchsergebnissen erhebt sich die Frage, ob Chloroquin einen Monoaminoxydase-hemmenden Effekt besitzt, wie er auf Grund einer chemischen Verwandtschaft des Chloroquins mit dem Iproniacid bereits von K r o n [15] diskutiert wurde. Ferner haben S c h e r b e l und H a r r i s o n [16] eine antirheumatische Wirkung des Iproniacids beschrieben. Durch inzwischen von H a b e r l a n d [17] durchgeführte einschlägige Untersuchungen konnte diese Vermutung nicht bestätigt werden. Es bleibt somit bei der Feststellung, daß die Hyaluronidase-Spreading-hemmende Wirkung des Chloroquins nicht an die Anwesenheit des Nebennierenmarks gebunden zu sein scheint, obwohl nach Untersuchungen von K r e i s e l m a i e r [17] der Katecholamingehalt des Nebennierenmarks nach Chloroquingabe abnimmt und damit eine Katecholaminausschüttung aus dem Nebennierenmark wahrscheinlich ist.

Da andererseits auch bei adrenalektomierten Tieren die Hyaluronidase-Spreading-hemmende Wirkung des Chloroquins erhalten bleibt, dürften mehrere Mechanismen hinsichtlich der Hyaluronidase-hemmenden Wirkung des Chloroquins vorliegen.

Zusammenfassung

Es wurde an männlichen weißen Ratten der Einfluß des Chloroquins auf das Farbstoff-Hyaluronidase-Spreading untersucht.

Chloroquin führt zu einer Hemmung des durch Hyaluronidase gesteigerten Farbstoff-Spreadings und diese Wirkung wird nicht durch ein Adrenolyticum oder einen Ganglienblocker aufgehoben.

Auch bei adrenalektomierten Tieren wird die spreadinghemmende Wirkung des Chloroquins, im Gegensatz zu den mit anderen Substanzen gefunden Verhältnissen, nicht aufgehoben. Unter Zugrundelegung bereits vorliegender Arbeiten über die spreadinghemmende Wirkung verschiedener Stoffe wird die bei Chloroquin vorliegende Wirkungsweise diskutiert.

Literaturverzeichnis

1) Mathies, H.: Pharmazie 14, 429 (1959)
2) Mathies, H.: Zschr. Rheumaforsch. 18, 205 (1959)
3) Mathies, H.: Arch. exp. Path. Pharmakol. 240, 31 (1960)
4) Mathies, H. u. Schlierf, G.: Med. Exp. 2, 334 (1960)
5) Mathies, H. u. Krott, H.M.: Ärztl. Forsch. XVI, I/521 (1960)
6) Domenjoz, R.: Arch. exp. Path. Pharmakol. 225, 14 (1955)
7) Mathies, H.: Zschr. Rheumaforsch. 18, 308 (1959)
8) Mathies, H.: Zschr. ges. exp. Med. 131, 118 (1959)
9) Mathies, H., Glück, A., Poulantzas, J., Schmidt, D.: Med. Exp. 1, 64 (1959)
10) Mathies, H.: Arch. int. Pharmacodyn. CXXIII, 334 (1960)
11) Mathies, H., Oestreich, G. u. Schwalbach, K.: in Vorbereitung
12) Schlierf, G.: Diss. München 1960
13) Mathies, H.: Med. Exp. in Druck
14) Mathies, H. u. Reindl, W.: in Vorbereitung
15) Kron, R.: Zschr. Rheumaforsch. 17, 384 (1958)
16) Scherbel, A. u. Harrison, P.: Ann. N.Y. Acad. Sci. 80, 820 (1959)
17) Kreiselmaier, G.: Diss. München in Vorbereitung

Ich danke Herrn Professor Dr. W. Seitz für die Überlassung des Themas und Herrn Dr. H. Mathies für die Anregung zu dieser Arbeit und die Unterstützung bei der Bearbeitung des Themas. Herrn Dipl.-Math. K. Liebrich bin ich für die Durchführung der statistischen Berechnungen dankbar.

Die Versuchssubstanz Chloroquin wurde uns freundlicherweise von der Firma Bayer-Leverkusen zur Verfügung gestellt.

Am 6. Januar 1937 wurde ich in Egira-Achaias, Grichenland, geboren. Hier besuchte ich 6 Jahre die Volksschule und 6 weitere Jahre das Gymnasium in Derwenion und absolvierte dort im Juni 1954 mein Abitur. Dann habe ich bis Ende Februar 1956 Unterricht in der deutschen Sprache genommen und in einer chirurgischen Klinik gearbeitet.

Im März 1956 kam ich nach Deutschland, wo ich im Mai 1956 mein Studium an der medizinischen Fakultät der Universität Marburg begann. Im 2. Semester wechselte ich zur Universität Kiel und schloß dort am 30. Oktober, nach dem 5. Semester, mein vorklinisches Studium mit der ärztlichen Vorprüfung ab. Das erste klinische Semester blieb ich an der dortigen Universität. Im April 1959 schrieb ich mich an der Universität München ein und beendete hier nach fünf weiteren Semestern mein Studium mit der ärztlichen Prüfung nach Abschluß des Wintersemesters 1961/62.